动 物 学 研 究 1998，19（3）：250—253 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

家蝇体内卵对 CAT 的摄入和传代的观察

INTAKING AND TRANSMISSION OF INJECTED CAT GENE BY HOUSEFLY EGGS

刘燕 刘维全

关键词 CAT 基因，家蝇，腹腔注射，基因转移

Key words CAT-gene，Housefly，Abdominal injection，Gene transformation

中图分类号 Q78

自从本世纪 70 年代初期重组 DNA 技术问世以来，科学家们经 20 多年的艰苦努力，基因工程无论在理论上还是在生产实际应用方面，都取得了惊人的成绩。在基因动物培育方面，多数研究是在哺乳动物，包括基因表达研究以及疾病模型和生物反应器的构建等，并且获得了可喜的进展和成果。但是由于受精卵来源有限，外源基因整合随机性极大以及成胚率和表达率低等原因，转基因哺乳动物的构建和发展受到经费投资大，技术设备要求高等条件限制，因此人们正在探索新的途径。昆虫转基因工程始于 80 年代初期，主要目的是将外源基因或 DNA 片段引入昆虫细胞，使之发生转化，以期收获珍贵的生物活性物质(Hemdler 等，1991；O'brochta 等，1988)。本实验的目的是试图通过外源基因腹腔直接注射法，探索外源基因能否进入家蝇体内卵，为家蝇的基因转移提供一个新的有效的方法，也为应用转基因家蝇作为生物反应器，表达和生产有用的基因产物，探索一条新的途径。目前，未见国内外有类似的报道。

1 材料和方法

1.1 家蝇 由军事医学科学院五所提供。家蝇饲养于 27℃、12 h 光照的条件下。成虫饲养于一纱笼内，喂以奶粉、白糖和水，羽化后 3 日即可开始收卵。幼虫可在 500 mL 罐头瓶内，以麦麸、水、奶粉、白糖(100：150：5：1)的混合物饲养。

1.2 显微注射针的制备 选择较细的毛细玻璃管，在拉针机上，制成内径约 1—2 μm 的注射针。

1.3 注射质粒的制备和线性化 ①注射质粒的制备：氯霉素乙酰转移酶表达质粒（phspCAT）DNA 的制备方法参照《分子克隆》(金冬雁等译，1992)。用生理盐水稀释其质粒 DNA，在分光光度计上测定其含量，然后置于-20℃备用；②质粒 DNA 的线性化：用 *Xho* I 限制酶(Sigma 公司购买)，按其操作方法对已纯化 phspCAT DNA 进行消化提纯，并溶于双蒸水中，测其含量，置-20℃贮存备用。

1.4 注射方法、条件以及家蝇卵和幼虫的收集 家蝇用乙醚麻醉后，将其放在解剖皿内，在解剖显微镜下，找准注射部位，1 只手用镊子将家蝇固定，另 1 只手持带有目的基因的注射针，用嘴含住胶管(自制)的另一端，缓缓地将针刺入约 1 mm 深的位置，然后轻轻地将液体吹入(注意不要将空气吹入)。本实验在同一饲养条件下，分别进行了 3 组试验：第 1 组选择腹部和背部两种不同的注射部位，用 1.5 μg 的剂量，分别注射刚羽化 36 h 的家蝇；第 2 组在同一注射剂量(1.5 μg)下，分别对 4 个时段(12、24、36、48 h)的家蝇进行注射；第 3 组对刚羽化 36 h 家蝇进行了 5 个不同剂量(1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 μg)的比较。

上述注射后的家蝇，在 27℃置笼内饲养，一旦开始产卵，就集中收集第 2 天内的卵。一部分保存(F_1)，一部分置 500 mL 罐头瓶内继续孵化，待幼虫培养 2 天后，收集一部分幼虫保存，其余部分继续

本文 1997-07-17 收到，1997-10-27 修回

化蛹→羽化→然后收集卵。

1.5　卵内核酸的提取　收取一定家蝇卵，用家蝇生理盐水(128 mmol/L NaCl，1.3 mmol/L KCl，134 mmol/L 蔗糖，1.8 mmol/L $CaCl_2$，2.4 mmol/L $NaHCO_3$ pH8.0)洗3次，用玻棒搅成均浆，然后加入等体积家蝇缓冲液(0.25 mol/L Tris-HCl，0.5 mol/L NaCl，1 mmol/L PMSF，5 mmol/L $NaHSO_3$)混匀，加入1/10体积冰冷的70%高氯酸(PCA)，在冰上感作15 min，10 000 r/min离心5 min，弃上清液，用5%PCA洗沉淀2次，回收沉淀。用2倍体积0.3 mol/L NaOH悬浮沉淀，在37℃下感作1 h，加入1/5体积的70%PCA，在冰中冷却10 min，用5%PCA洗涤沉淀1次，回收上清液。将沉淀溶于8/10体积1.5%PCA，在90℃感作20 min，加1/20体积的1.5%PCA，在冰上冷却，用1.5%PCA洗涤沉淀1次，回收上清液。合并上两次上清液，用酚/氯仿抽提，2倍体积冷无水乙醇沉淀，最后溶于TE中，贮于-20℃待用。

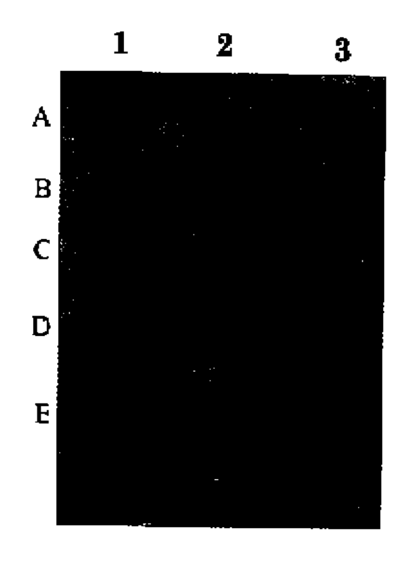


图1　影响注射结果的因素比较(点杂交结果)

Fig. 1　Dot hybridization of the factor of affecting injection effect

第1列示剂量比较，1A、1B、1C、1D、1E依次为1.0、1.5、2.0、2.5和3.0 μg；第2列示时间比较，2A、2B、2C、2D依次为12、24、36、48 h；第3列示部位比较，3A、3B示腹注，3C、3D示背注；2E阳性质粒(phspCAT)对照；3E阴性(正常家蝇卵)对照。

1. The amount of phspCAT injected into 36-hour housefly from 1A to 1E are as follow: 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 μg; 2. The time injected into housefly with 1.5 μg phspCAT from 2A to 2D are as follow: 12, 24, 36, 48 h; 3. The ways injected into housefly with 1.5 μg phspCAT are two: 3A and 3B are injected through the abdomen, 3C and 3D through the back; 2E. positive control (phspCAT); 3E. negative control (normal hoosefly eggs).

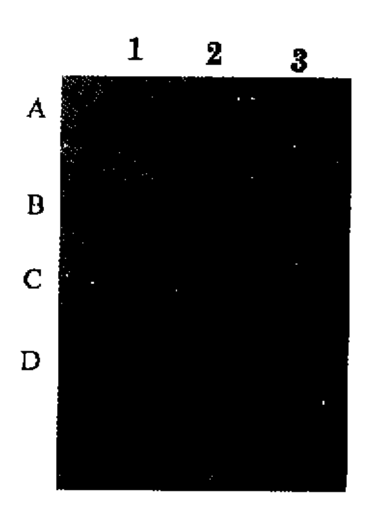


图2　注射家蝇传代点杂交图

Fig. 2　Dot hybridization of passage of injected housefly

腹注总共3批，1A、1B、1C为第1批F_1卵、F_1幼虫、F_2卵；2A、2B、2C为第2批F_1卵、F_1幼虫、F_2卵；3A、3B、3C为第3批F_1卵、F_1幼虫、F_2卵；1D阳性质粒(phspCAT)对照；2D阴性(正常家蝇幼虫)对照；3D阴性(正常家蝇卵)对照。

The injected housefly with 1.5 μg phspCAT through abdomen injection about three times. 1A, 1B and 1C are separately F_1 eggs, F_1 larvae and F_2 eggs for the first times; 2A, 2B and 2C are separately F_1 eggs, F_1 larvae and F_2 eggs for the second times; 3A, 3B and 3C are separately F_1 eggs, F_1 larvae and F_2 eggs for the third times; 1D positive control (phspCAT); 2D negative control (normal housefly larvae); 3D negative control (normal housefly eggs).

1.6　检测

1.6.1　点杂交膜和Southern杂交膜的制备　①点杂交膜的制备：将硝酸纤维素膜于水中浸润后，置20×SSC(3 mol/L NaCl，0.3 mol/L 柠檬酸钠 pH 7.0)中浸泡1 h，再放入1×SSC中浸泡，待稍干。将DNA样品直接置沸水中变性10 min，然后迅速置冰浴中，最后点样每孔5 μL，将点好样的膜置室温下

待其自然干燥，然后在真空下于 80℃干烤 2 h。(2)DNA Southern 杂交膜的制备：将样品经琼脂糖凝胶电泳后，再转移至硝酸纤维素膜上，转移完毕，将滤膜浸于 6×SSC 溶液中，取出凉干，真空 80℃干烤 2 h 待用。

1.6.2 DNA 标记、杂交、显色 将已线性化的 phspCAT DNA 用 digoxigenin 标记，并按 digoxigenin-dUTP DNA 标记与检测方法进行杂交、显色。



图 3 注射家蝇的传代 Southern 杂交结果

Fig. 3 Southern hybridization of passage of injected housefly

1. F_1 代卵的核酸提取物；2. F_2 代卵的核酸提取物；3. 阳性对照(phspCAT)；4. 阴性对照(正常家蝇卵的核酸提取物)；5. 阴性对照(正常家蝇幼虫的核酸提取物)。

1. F_1 eggs; 2. F_2 eggs; 3. positive control (phspCAT); 4. negative control (normal housefly eggs); 5. negative control (normal housefly larvae).

2 结果

2.1 本实验选择了背部和腹部两个进针部位，对羽化 36 h 的家蝇注射 1.5 μg 量的外源基因，发现腹部注射效果优于背部注射(图 1)。但死亡率则相反，腹部注射死亡率大于背部注射。

2.2 在注射量方面 本实验选择了 1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0 μg 5 个浓度梯度的溶液进行注射，结果显示(图 1)，卵内外源基因的量并不与注射量成正比。在 1.5 μg 处为一分界线，注射 1.5 μg 的量效果较理想；在 1.5 μg 之前呈正相关，即随着注射量的增加，检测结果越好，也就是说外源基因进入卵内越多；在 1.5 μg 之后，随着注射量的增加，外源基因进入卵内的量变化不明显，相反地，注射家蝇死亡率增大。

2.3 注射羽化后不同时期的家蝇，外源基因进入卵的效率不同(图 1)。在饲养条件不变的情况下，选择了羽化 12、24、36、48 h 4 个时间段作为研究对象，其结果显示，羽化 36 h 时开始注射效果比较理想。

2.4 将羽化 36 h 的家蝇注射后，在 27℃置笼内饲养，隔 1 天开始收卵，集中收集第二天内的卵。一部分卵保存(F_1)；一部分置 500 mL 罐头瓶内继续孵化，待幼虫培养 2 天后，收集一部分卵保存，一部分待其继续化蛹→羽化→然后收卵(F_2)。粗提后，经非放射性点杂交后，注射 3 批的结果显示(图 2)，在 F_1 卵、F_1 幼虫、F_2 卵中均检出有外源基因的存在，说明外源基因进入了卵内，并且至少可保持到 F_2 代卵。

2.5 通过 Southern 杂交表明(图 3)：进入 F_1 和 F_2 中的外源基因在大小和特异性方面均未发生变化，至于外源基因在体内是否复制，究竟有何变化，目前还不清楚。

3 讨论

目前转基因动物的培育在基因的导入方法上主要有：显微注射法、电穿孔法和聚阳离子-DMSO 转染法，另外，亦有报道磷酸钙转染技术、葡聚糖转染技术等。最常用的是显微注射法(Morris 等，1989)，与一般哺乳动物受精卵不同的是：家蝇卵卵壳比较硬，用一般的玻璃毛细管，要穿透如此硬的卵，并且无损伤地把外源基因送到卵内，是非常困难的。相反地，我们采用将外源基因直接注入到成蝇体内，经过培养，在其 F_1 卵、F_1 幼虫和 F_2 卵中，均检测到有外源基因的存在。与一般注射方法相比，此方法操作简单，成胚率高，需要的设备少，费用少，在一般的实验室，只要有一台解剖显微镜均能工作，因此可以作为外源基因导入如家蝇等卵生昆虫卵内的一种比较适用的方法。

卵黄蛋白原(Vg)是通过滤泡上皮细胞间形成"滤泡开放"时到达卵母细胞表面的。Vg 到达卵母细胞表面后，通过与膜上受体结合，形成被膜小凹以及被膜小泡，最后进入卵母细胞内。至于家蝇卵母细胞对 Vg 的摄取，最近龚和(1990)和邱威等(1991)通过电镜切片和光镜观察首次证实了家蝇 Vg 是通过"滤泡开放"进入细胞的。笔者认为，外源 DNA 如果作为特殊的营养物质，它也可能以 Vg 进入卵内相类似途径

而到达体内卵中。

1974 年 Adams 根据家蝇卵母细胞发育的特点，将其卵巢发育分为 10 个阶段，其中第 1—4 阶段为卵黄发生前期。在我国龚和(1990)和邱威等(1991)研究发现，家蝇在 27℃左右的饲养条件下，羽化 0—24 h(第 2—3 阶段)为卵黄发生前期。刚羽化时，卵原细胞则从生长区分化出来，并分裂成 16 个细胞；至羽化 24 h，卵母细胞分化出来，其余 15 个细胞则形成为滋养细胞。此期脂肪体的功能以贮存为主。羽化 36 h，卵黄蛋白（Vt）开始在卵母细胞中出现，并且大量沉积，可见卵内卵黄沉淀区明显扩大，至羽化 60 h 时（第 8 阶段），卵母细胞内卵黄沉淀区占整个卵母细胞的 80%左右。羽化后 72—84 h（第 9—10 阶段）为卵黄发生后期，此期卵母细胞除了沉淀其余的空间 Vt 外，其滤泡上皮细胞逐步形成卵壳。在本实验中，选择了羽化后 12、24、36 和 48 h 的成蝇分别注射 1.5 μg 量的外源基因，通过杂交显示，证实 36 h 注射效果最佳，即 CAT 基因与卵黄蛋白基本上是同步进入卵内的。

将外源基因注人成蝇体内，获得了 G0 期蝇，收其卵，经点杂交几乎均得阳性结果。为了进一步证实外源基因是由于吸附于卵壳上而呈假阳性，还是真正地被卵吸收进入卵内，获得了 G0 期蝇，收其卵，通过非放射性点杂交，其幼虫体内有外源基因的存在，进一步说明了外源基因确实进入到了卵内，也进一步证实了体内直接注射法可作为外源基因进入卵内的一种有效方法。

通过 Southern 杂交显示出，外源基因进入卵后，经过 F_1 (G0)、F_2 代，其间经过了 17—18 天左右，在 F_2 中仍检测到与注射基因大小和特异性相同的片段，这说明经注射的外源基因进人了卵内，且传至 F_2 代。那么外源基因进入卵内后命运如何？我们认为，外源基因经滤泡开放进入卵内，其去向可能有两种情况：外源基因毕竟不是家蝇卵内本身的成分，进入体内，必然立即被溶酶体识别，并为其所降解，最终经过胞吐作用排出卵外；另外，真核生物中普遍存在的转位基因，现已知悉，果蝇中多达 15%的 DNA 片段(达 50 次)(Rubin 等，1982；O'brochta 等，1988)，也许在家蝇体内存在转位因子，外源基因进入卵内后，依靠其转位特性，将外源基因转移至染色体上进行整合复制。至于在家蝇体内是否存在类似果蝇中转移因子 P 的转位因子，以及外源基因在体内是否复制及机理，还需以后进一步的研究证实。

刘　燕[①]　　刘维全[②]　　孟佩芸[①]
LIU Yan[①]　　LIU Wei-quan[②]　　MENG Pei-yun[①]
金宁一[②]　　韩慧民[②]　　殷　震[②]
JIN Ning-yi[②]　　HAN Hui-min[②]　　YIN Zhen[②]

(①成都军区后勤部军事医学研究所　昆明　650032)
(①*Medical Research Institute of Chengdu Military Area*，*Kunming*　650032)
(②中国人民解放军农牧大学　长春　130062)
(②*University of Agriculture and Animal Sciences of PLA*，*Changchun*　130062)